



ISSN 1676 - 1340

Dezembro, 2002

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 38

Expressão do Gene *rolA* em Sistema Baculovírus

William Sihler
Mercy Santos Oliveira
Mauro Carneiro
Marlinda Lobo de Souza

Brasília, DF
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF
CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600
Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual
Membros: Antônio Costa Allem
 Marcos Rodrigues de Faria
 Marta Aguiar Sabo Mendes
 Sueli Correa Marques de Mello
 Vera Tavares Campos Carneiro
Suplentes: Edson Junqueira Leite
 José Roberto de Alencar Moreira
Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual
Revisor de texto: Miraci de Arruda Camara Pontual
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi
Tratamento de ilustrações: Alysson Messias da Silva
Edição eletrônica: Alysson Messias da Silva

1ª edição

1ª impressão (2002): tiragem 150 exemplares.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Expressão do Gene *roIA* em Sistema Baculovírus / William Sihler... [et al.]. - Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.

26 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; n. 38).

1. Sistema de expressão. 2. Gene *roIA*. I. Sihler, William. II. Título. III. Série.

581.35 CDD - Ed. 21

© Embrapa 2002

Sumário

| | |
|---|----|
| Resumo | 5 |
| Abstract | 7 |
| Introdução | 9 |
| Material | 10 |
| Métodos | 12 |
| Resultados e Discussão | 21 |
| Referências Bibliográficas | 26 |

Expressão do Gene *rolA* em Sistema Baculovírus

*William Sihler*¹

*Mercy Santos Oliveira*²

*Mauro Carneiro*³

*Marlinda Lobo de Souza*⁴

Resumo

As características morfológicas conferidas a plantas infectadas com *Agrobacterium rhizogenes* tem como principal responsável a expressão do gene *rolA*. Dentre as anomalias causadas por esse gene estão a redução de porte da planta, inibição do crescimento da raiz e retardamento da floração.

O entendimento do mecanismo de ação dessa proteína pode ser de utilidade na manipulação da estatura das plantas levando, por exemplo, ao aumento de densidade de plantio e conseqüentemente elevando a produtividade agrícola. Atualmente, o principal impedimento no estudo de *rolA* é a baixa concentração da proteína encontrada nos tecidos onde ela é funcional. Na tentativa de obter quantidades maiores da proteína, escolhemos o sistema de expressão baculovírus em células de insetos, o qual fornece um ambiente apropriado para a síntese de proteínas heterólogas. Casos de expressão de genes heterólogos em níveis de 25-50% da proteína total de células infectadas já são relatados na literatura. Nesse trabalho, o gene *rolA* foi clonado no vetor pFastBac HTb e transformado em células DH10Bac (Life Technologies), contendo o genoma viral do AcMNPV. Esse DNA foi cotransfectado em células SF 9 (*Spodoptera frugiperda*), resultando em vírus recombinantes defectivos na produção de poliedrina. Um vírus recombinante foi escolhido para análise de expressão,

¹ Biólogo, MsC, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Graduanda em Biologia, Universidade Católica de Brasília (UCB)

³ Biólogo, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

denominado v-rolA. Células controle e células infectadas com o vírus foram coletadas após 48h de incubação e os seus perfís de proteínas analisados em gel de poliacrilamida desnaturante. Foi observado na amostra de células infectadas, além da diminuição de expressão de peptídeos celulares e aparecimento de proteínas virais, a presença de uma banda de peso molecular com cerca de 11Kda, conforme esperado para a proteína RolA. A observação das amostras por microscopia óptica e eletrônica mostrou a evolução da infecção viral. Após 24h de infecção pode-se observar a hipertrofia do núcleo e aparecimento de corpos densos, relativos à formação do estroma virogênico. Estudos de "western blotting" de detecção da hibridização por luminescência foram realizados, utilizando um anticorpo policlonal contra RolA desenvolvido em coelho. A afinidade desse anticorpo pela amostra celular infectada sugere fortemente que o produto expresso pelo gene *rolA*, clonado no vírus, apresenta as características da proteína encontrada naturalmente em plantas infectadas.

Atualmente, pesquisas vem sendo desenvolvidas pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para o estudo das propriedades bioquímicas, biofísicas e estruturais da proteína rol A. Tais informações irão auxiliar na elucidação dos processos funcionais desta molécula, abrindo perspectivas para utilização da mesma na regulação de programas de desenvolvimento de plantas.

Expression of the *rolA* gene in a baculovirus system

Abstract

The morphological features conferred to plants infected with *Agrobacterium rhizogenes* have the *rolA* gene as the main responsible. Amongst the anomalies caused by this gene there is the reduction of the plant size, root growth inhibition and budding retardation. Understanding the molecular way of action of this protein can be of utility in the manipulation of the stature of plants leading, for example, to the increase of plantation density and consequently raising the agricultural productivity. Currently, the main difficulty in the study of RolA is the low concentration of the protein found in tissues where it is functional. In the attempt to get bigger amounts of the protein, we choose the baculovirus expression system in insects cells, which supply an appropriate environment for heterologues protein synthesis. Expression levels of 25-50% of the total protein of infected cells are already mentioned in literature for heterologues genes . In this work the *rolA* gene was cloned in the pFastBac HTb vector and transformed into DH10Bac cells (Life Technologies), which contains the viral genome of the AcMNPV. This recombinat viral DNA was cotransfected in SF 9 cells, resulting in polyhedrin defective recombinant viruses. A recombinant virus was chosen for expression analysis, which was called v-rolA. Control and infected cells were collected after 48h incubation and their protein profiles analyzed in polyacrilamide denaturing gel. The presence of a 11 kDa peptide was observed in the infected cells, as expected for RolA, besides a decrease in the cellular peptide expression and appearance of some viral proteins. The visualization of the samples by optic and electronic microscopy showed the progress of the viral

infection. After 24h of infection the nuclei hypertrophy and dense bodies appearance can be observed, due to the virogenic stroma formation. Western blot studies for hybridization detection by luminescence had been carried out, using a polyclonal antibody against RolA developed in rabbit. The affinity of this antibody for the infected cellular sample suggests that the expressed product for the gene *rolA*, cloned into the virus, presents similar features of the protein originally found in infected plants.

Currently, research is being developed by Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia in order to study the biochemical, biophysical and structural properties of the RolA protein. Such data will help in the unraveling the functional processes of this molecule, opening perspective for its use in the regulation of plant development programs.

Introdução

A *Agrobacterium rhizogene* é um fitopatógeno do solo que provoca o crescimento de raízes adventícias (“raízes em cabeleira”) no local de infecção. Essa bactéria possui um plasmídeo de tamanho variável de 200 a 800 kpb chamado Ri, que contém uma região denominada T-DNA, responsável pela síntese de uma fita simples do plasmídeo Ri e sua integração ao genoma da célula vegetal. O plasmídeo Ri pode apresentar regiões T-DNAs denominadas TR e/ou TL, codificando para opinas ou para genes que conferem o fenótipo Ri ou “síndrome das raízes em cabeleira”. Nesse último caso foram determinados ORFs que codificam para os genes *rolA*, *rolB*, *rolC* e *rolD* (Slightom et al., 1986). Esses genes *rol* foram estudados individualmente e em conjunto para a determinação de suas atividades no processo de infecção.

Ao gene *rolA* foi conferida a capacidade de diminuição do comprimento dos internodos devido à inibição da elongação celular; folhas enrugadas em consequência dessa mesma inibição nas veias; diminuição no número e tamanho das flores e atraso na floração por cerca de seis semanas; coloração verde escura das folhas, além de crescimento deficiente das raízes.

É importante a descoberta da função molecular de *rolA* para determinação de sua ação com outros fatores envolvidos na geração de um fenótipo alterado. Existem suposições de que as alterações fenotípicas estejam relacionadas à mudanças do conteúdo hormonal nas plantas. Duas hipóteses foram levantadas: a primeira seria que o produto do gene *rolA* poderia estar participando direta ou indiretamente da recepção ou da via de transdução de sinal de auxina na membrana plasmática; ou que poderia estar afetando a síntese ou maturação de alguns elementos dessa via e alteração no gradiente de auxinas em caules.

O fato do gene *rolA* estar relacionado ao nanismo pode ser de utilidade na manipulação da estatura em plantas transgênicas. No entanto, um dos principais problemas nos avanços de sua pesquisa reside nas baixas concentrações desta proteína nos tecidos nos quais a ela é funcional, impossibilitando uma caracterização bioquímica e estrutural plena da mesma. Outro impedimento relaciona-se com a dificuldade do processo de purificação em si, devido à sua susceptibilidade ao ataque de proteases e inexistência de um teste funcional marcador desta proteína. Atualmente, diferentes sistemas de expressão gênica

podem ser empregados visando uma maior produção de proteínas facilitando o processo de purificação.

Dentre os objetivos dos diferentes sistemas de expressão estão a produção de proteínas em grandes quantidades, a custos baixos. Entretanto, o maior desafio está na obtenção de produtos ativos. Desta maneira, em geral, sistemas de expressão eucarióticos destacam-se por diversas vantagens sobre os sistemas procarióticos.

O sistema de expressão baculovirus se tornou uma importante ferramenta em biotecnologia. Ele tem se mostrado altamente eficiente e tem proporcionado um amplo uso na medicina como agentes terapêuticos, profiláticos (vacinas) e para diagnose. (O'Reilly, 1992). Dentre as vantagens para sua utilização estão: potencial para expressão de proteínas em altos níveis; existência de promotores fortemente ativos durante a fase tardia da infecção (não interferindo no ciclo viral); diferentes fases na regulação gênica do ciclo viral, oferecendo oportunidade de expressão de genes heterólogos sob diferentes condições celulares; capacidade para clonagem de grandes inserções; eficiência na expressão de genes contínuos (sem íntrons) e cDNAs; e simplicidade de manipulação. Nesse trabalho é apresentada a subclonagem do gene *rolA* e sua expressão em sistema baculovírus "Bac-to Bac" (Life Technologies). A expressão e purificação da proteína Rol A irá portanto permitir a localização da mesma na planta, a nível subcelular, através da utilização de técnicas de imunocitoquímica e microscopia eletrônica, após da produção de anticorpos monoclonais anti-RolA,

Material

1) Vírus: Foi utilizado o Nucleopoliedrovírus de *Autographa californica* como controle e como parte do kit "Bac-to Bac" da Life Technologies.

2) Células de inseto: Foi utilizada a linhagem de *Spodoptera frugiperda* (SF 9) para os experimentos de transfecção, "plaque assay" e amplificação do vírus selvagem (AcMNPV - L1) e recombinante (**v-rolA**), bem como para análise por microscopia eletrônica.

Para manutenção da linhagem celular SF 9, utilizou-se o meio de cultura para células de inseto TNMFH (GIBCO Laboratories), seguindo-se as instruções do

fabricante para o seu preparo. Além da adição do antibiótico (sulfato de gentamicina, 100µg/ml), o meio era complementado com 10% de Soro Bovino Fetal estéril e livre de micoplasma, inativado à 56°C/30 min (meio completo).

3) Bactérias: Foi utilizada a linhagem mutante de *E. coli* "XL-1 blue" (Stratagene) para transformação e posterior amplificação dos plasmídeos contendo as inserções a serem clonadas. A linhagem DH10Bac contendo o DNA de AcMNPV, proveniente do kit Bac to Bac, também foi utilizada, segundo instruções do fabricante.

O meio LB (Luria-Bertani) foi utilizado para crescimento de bactérias transformadas: Bactotripton 10 g; Extrato de levedura 5 g; Cloreto de sódio 0,2 M e completado o volume para 1.000 ml com dH₂O. No caso de preparo de meio sólido para placas, adicionava-se agar 1,4%.

Para seleção de transformantes resistentes à ampicilina, adicionava-se 100 mg/ml da mesma ao meio. Os ensaios de atividade de b-galactosidase (fenótipo de cor azul ou branco) eram feitos em meio sólido, adicionando-se 25 µg/ml de X-Gal e 20 µg/ml de IPTG.

4) Plasmídeo pGras13: O plasmídeo pGras13 contém a sequência do gene *rolA* anteriormente clonado pelo Dr. Mauro Carneiro. O cassete de clonagem foi retirado pela digestão com *Bam* HI e *Eco* RI.

5) Plasmídeo de transferência (pHtb): O plasmídeo pHtb é componente do kit Bac to Bac, contendo uma sequência de seis histidinas a serem utilizadas para facilitar a purificação da proteína e foi escolhido por oferecer o quadro de leitura ("open reading frame") ideal para a clonagem do gene *rolA*.

6) O anticorpo anti-RoIA: O anticorpo policlonal anti-RoIA foi cedido pelo Dr. Mauro Carneiro. Sua obtenção foi realizada pela inoculação de RoIA (obtida de um processo de fusão dessa proteína com a proteína GST, após tratamento com trombina) em coelhos de acordo com procedimento descrito por Harlow & Lane (1988).

Métodos

1) Isolamento de clones virais por “plaque assay”: Para obtenção de um clone viral, era necessário que fosse feita infecção de cultura de células em placa, imobilizadas por meio sólido. Assim, cada placa de infecção formada seria proveniente de uma única partícula viral.

Seguia-se o procedimento descrito por Lee & Miller (1978). Células eram sedimentadas numa concentração de 2×10^6 /placa de 60 mm seguida de incubação por 1 h à 27°C. Preparavam-se cinco diluições (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}) dos estoques virais, em meio TNMFH. O meio era então aspirado da monocamada de células, as quais, em seguida, eram infectadas com 500 µl de cada diluição viral e incubadas por 1 h com agitação à cada 10 min. Preparava-se a camada de 0.5 % agarose-ME (Seakem-FMC Bioproducts) e deixava-se esfriar até atingir 37°C. O inóculo viral era retirado e 4 ml de camada de agarose eram colocados sobre as células. Após solidificação do meio, as células eram incubadas à 27°C por 4 dias.

Experimentos de infecção e diluições virais para “plaque assay” utilizavam meio TNMFH sem soro durante os estágios iniciais de infecção para evitar a inibição de adsorção de partículas virais nas células.

2) Amplificação viral (segundo O’Reilly et al., 1992): O vírus selvagem AcMNPV-L1, bem como o recombinante *v-rolA*, foram amplificados em cultura de células de inseto SF 9. Inicialmente um clone do vírus era purificado através de três experimentos de “plaque assay” consecutivos, a partir de um estoque viral. Este procedimento tinha por finalidade diminuir o risco de mutações do vírus decorrente de passagem seriada em cultura de células. Para o vírus recombinante o objetivo era a eliminação de vírus contaminantes que não contivessem o inserto desejado.

As células eram então semeadas em placas de petri de 35 mm, numa concentração de 1×10^6 células, e incubadas por uma hora com o inóculo viral (região da agarose apresentando vírus no “plaque assay” diluído em 1 ml de meio TNMFH). Adicionava-se em seguida, 1 ml de TNMFH por placa e as células eram mantidas em estufa à 27°C por 4 dias. O sobrenadante era coletado, centrifugado e mantido à 4°C (primeira passagem). Outro método de

amplificação utilizado era inoculação de células em frascos T-25 na concentração de 3×10^6 células.

3) Isolamento de DNA de vírus não ocluso (segundo O'Reilly et al., 1992):

A partir do sobrenadante de células infectadas, os vírus extra-celulares eram passados através de colchão de sacarose 25% e tratados com proteinase K (500 µg/ml) à 37°C, por um período mínimo de 4 horas. O DNA viral era extraído com fenol, clorofane e clorofil. O DNA era então precipitado com sal:etanol, centrifugado à 12.000 g/30 min e lavado com etanol 70%. A ressuspensão era feita à 37°C por 12h, e então mantido à 4°C, para uso.

4) Preparação de células competentes: Células competentes eram preparadas de acordo com Mandel & Higa (1970), com modificações. Um inoculo de células "XL-1 blue" eram crescidas em 5 ml de meio LB à 37°C por 12 horas. Então utilizava-se 500 ml deste material para inocular 500 ml de meio LB em um frasco de 2 L. A incubação era feita à 37°C sob agitação (200 rpm). As células cresciam até o início da fase exponencial quando sua absorbância A_{660} atingia 1,0. O frasco era colocado no gelo e em seguida o material centrifugado à 12.000 g/5 min à 20°C. O precipitado era lavado em CaCl_2 0,1M gelado e novamente centrifugado. O precipitado era mais uma vez ressuspenso no mesmo volume da solução acima e deixado no gelo por 1 hora. As células eram então coletadas por centrifugação (10.000 g/10 min) e ressuspendidas cuidadosamente em 10 ml de CaCl_2 0,1M gelado em glicerol 20%. O material era aliqotado em tubos de microcentrífuga com o volume de 300 µl e estocados a -80°C por no máximo dois meses.

As células competentes DH10Bac foram preparadas segundo instruções do fabricante.

5) Transformação de células competentes:

- **XL-1 Blue:** A transformação de células competentes seguiu o protocolo de Sambrook et al. (1989). À 100 µl de células competentes adicionava-se o DNA plasmidial e incubava-se no gelo por 30 min. Dava-se um choque térmico de 42°C por 2 min e novamente incubava-se no gelo por 5 min. Adicionava-se então, 1 ml de meio de cultura (LB), e incubava-se à 37°C por 1 hora para restabelecimento e crescimento das células transformadas. Precipitava-se as células a baixa centrifugação (1000 g/2 min à temp. ambiente), ressuspendia-se

o precipitado em 100 ml de LB e plaqueava-se em meio sólido. Após incubação à 37°C por 18 h, observava-se o aparecimento de colônias.

Plasmídeos obtidos em sistemas de ligação eram diluídos 1:5 água Milli-Q e uma alíquota de 5 ml era usada para transformação de 100 ml de células competentes.

- **DH10Bac:** A transformação e seleção foram feitas segundo as instruções do fabricante.

6) Isolamento de plasmídeos por lise alcalina (“mini-prep”): Conforme descrito por Sambrook et al. (1989), cresciam-se colônias bacterianas de interesse em 2 ml de meio LB à 37°C/14 h. Centrifugava-se 1,5 ml desse material, em tubo de microcentrífuga, à 12.000 g/30 seg, descartando o sobrenadante. O volume de 500 µl restante era guardado à 4°C para servir de inóculo posterior. Ressuspendia-se o precipitado em 100 µl de solução I gelada (Glicose 50 mM; Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM; EDTA 10 mM.) misturando vigorosamente (vórtex). Adicionava-se então 200 µl de solução II (NaOH 0,2 N; SDS 1%) , invertendo-se o tubo algumas vezes para misturar, incubando-se em seguida no gelo. Acrescentava-se 150 µl de solução III gelada (60 µl de acetato de potássio 5M; 11,5 µl de ácido acético glacial, e completar para 100 µl com dH₂O), agitava-se vigorosamente em vórtex e incubava-se em gelo por 5 min. Nova centrifugação era feita à 12.000 g/5 min e o sobrenadante transferido a um novo tubo. Extrações subsequentes com fenol, clorofane e clorofil eram realizadas, sempre transferindo-se a fase aquosa de uma etapa à outra. O DNA era precipitado com sal:etanol, lavado com etanol 70%, seco e ressuspensão em 20 µl de TE e conservado à 4°C.

7) Amplificação e purificação de plasmídeos: Uma vez que colônias isoladas contendo os plasmídeos de interesse eram obtidas, escolhia-se uma para amplificação. O inóculo era feito em meio seletivo (LB com ampicilina 100 µg/ml), incubado à 37°C sob agitação (150 rpm - Orbit Environ Shaker; Lab-Line Instruments) por 18 h. Purificava-se o plasmídeo através de colunas QIAGEN, segundo instruções do fornecedor.

8) Eletroforese em gel de agarose: Os géis de agarose eram preparados numa concentração de 1% em TAE 1X, contendo 200 mg/1000 ml de brometo de etídeo, de acordo com Sambrook et al, 1989. A agarose era derretida em forno

de microondas até que a solução ficasse homogênea. Resfriava-se à 65°C e derramava-se na bandeja apropriada da cuba de eletroforese para solidificação. Uma vez solidificado, o gel era submergido na cuba contendo TAE 1X e 200 mg/l de brometo de etídeo.

As amostras, ressuspensas em tampão de aplicação, eram colocadas nos poços e uma corrente elétrica constante de 40 V era aplicada ao gel.

9) Recuperação de bandas isoladas em de gel de agarose: Para recuperação de fragmentos de DNA isolados em gel, corria-se a amostra em agarose de baixo ponto de fusão 1% (SeaKem). Esta agarose possui a propriedade de derreter à 68°C, temperatura abaixo daquela de desnaturação de DNAs, permitindo portanto a purificação de bandas.

Como alguns dos fragmentos a serem purificados tinham como objetivo a clonagem, nunca utilizava-se o corante brometo de etídeo no sistema de eletroforese. Sempre que possível, corria-se uma pequena alíquota do material a ser purificado, bem como o marcador de peso molecular, distante do poço da amostra principal. Após a corrida, o lado do gel contendo o marcador e a alíquota eram cortados, corados em água com brometo de etídeo, visualizados sob UV sobre filme plástico, ao lado da parte não corada do gel. Por comparação, cortava-se a região correspondente à banda desejada da parte não corada.

Submetia-se a agarose a banho maria à 68°C/5 min. Imediatamente após derretimento da agarose, fazia-se extração com fenol saturado (Tris 0,1 M) contendo 1M NaCl. Prosseguia-se extração da fase aquosa com clorofane e clorofil. Seguia-se a precipitação com sal:etanol e lavagem com etanol 70%. O precipitado era ressuspenso em água e uma alíquota usada em nova eletroforese para checagem da pureza e integridade do fragmento. A solução de DNA era mantida à 4°C.

10) Síntese de sonda radioativa: A sonda utilizada para hibridização “Southern” foi obtida da banda *Bam* HI/*Eco* RI de aproximadamente 300 pb plasmídeo pGras13.

Após a digestão do plasmídeo pGras13 com enzimas de restrição, a amostra era submetida a eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão, à 40V/12h

para separação das bandas. Cortava-se a banda de 300 pb para purificação, conforme descrito acima.

A marcação era feita com o “kit” “rediprime DNA labelling system” (RPN1633 - Amersham), utilizando ^{32}P - α -dCTP (Amersham), com atividade específica de 3.000 Ci/mmol, de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento era diluído em 45 ml de água, numa concentração de 25 ng, fervido por 5 min para desnaturação, rapidamente centrifugado (microcentrifuga) e adicionado ao “labelling mix”. Misturava-se 5 ml do ^{32}P - α -dCTP seguido por centrifugação e incubava-se o tubo à 37°C por 10 min. A reação era parada pela adição de 5 ml de EDTA 0,2 M.

11) Amplificação de *rolA* por PCR: Para a multiplicação da região codificadora de *rolA*, utilizou-se o sistema de síntese “in vitro”, PCR. As reações foram realizadas em termociclador MiniCycler-PT-150 da MJ Research. Utilizou-se os “primers” externos à *rolA* pic1 e pic2 para amplificação do gene. Os sistemas eram feitos com água milli-Q, contendo as concentrações finais de: 1 ng de DNA molde (*v-rolA*), 400 ng de cada “primer”, 0,4mM de cada dNTP, 1 U de enzima Taq polimerase e tampão 1x para Taq polimerase, cobertos com óleo mineral.

A determinação da temperatura ideal para anelamento dos “primers” foi feita diminuindo-se a temperatura de desnaturação (T_m) dos mesmos na faixa de 10°C. A otimização do processo mostrou ser 47°C uma temperatura capaz de favorecer o anelamento dos “primers” à sequência de interesse. A amplificação foi realizada de acordo com as condições a seguir:

- passo I (desnaturação): 95°C/5 min;
- passo II (desnaturação): 95°C / 1 min e 30 s;
- passo III (anelamento): 47°C / 1 min e 10 s;
- Passo IV (elongação): 72°C / 1 min e 30 s;
- repetição dos passos de II-IV por 20 (ou 35) ciclos;
- elongação 72°C / 10 min
- manutenção à 4°C até análise ou isolamento de bandas em gel.

12) Clonagem de *rolA* no plasmídeo pHtb: O gene *rolA* foi obtido através da digestão do plasmídeo pGras13 com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI, liberando um fragmento de aproximadamente 300 pares de base. Esse fragmento foi então purificado em gel de baixo ponto de fusão e diretamente clonado no plasmídeo

pHtb previamente digerido com as mesmas enzimas. As ligações foram feitas usando-se uma proporção 5:1 de *roIA* (inserto) para pHtb (vetor), com a concentração de DNA abaixo de 300 ng, em um volume de 10 ml. A incubação foi feita com 2 U de enzima T4 ligase (BRL), à 16°C por 48 h.

Após transformação de células competentes e plaqueamento em meio seletivo (ampicilina, na presença de X-gal e IPTG), várias colônias brancas foram obtidas. Através de “mini-preps”, o perfil dos DNAs plasmidiais foram analisados por digestão com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI (10U/ mg), para liberação do inserto de cerca de 300 pb. Um clone foi escolhido constituindo-se no novo plasmídeo pHtb-*roIA*.

13) Transformação de células DH10Bac: Após a confirmação, amplificação e purificação do plasmídeo pHtb-*roIA*, o mesmo foi utilizado para transformar células DH10Bac através de eletroporação, onde ocorreria a recombinação do mesmo com o DNA viral de AcMNPV.

A seleção do clone contendo o vírus recombinante deu-se em meio LB com kanamicina (50 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml), X-Gal (100 µg/ml) e IPTG (40 µg/ml). O clone selecionado foi amplificado e o DNA viral purificado através de método descrito pelo fabricante do kit Bac to Bac.

14) Hibridização Southern blot: Após corrida de géis de agarose, com amostras do DNA viral de AcMNPV e *v-roIA* digeridos com enzimas de restrição, era feita a transferência das bandas para membranas de nylon para posterior hibridização com sonda radioativa específica.

O método de hibridização Southern blot, por transferência por capilaridade, seguiu o protocolo descrito por Ausebel et al (1994). Inicialmente o gel era imerso em solução de depuração por 15 min, sob agitação lenta. Este tratamento com ácido (HCl 0,25 N) parcialmente depurina o DNA e auxilia na transferência de fragmentos grandes. Uma rápida lavagem do gel era feita com água destilada, e em seguida era adicionada solução desnaturante (NaOH 0,5 N; NaCl 1,5M.). Nesta etapa, o DNA é desnaturado e os resíduos depurinados são hidrolizados.

O gel era então colocado sobre um filme plástico e uma membrana de nylon era sobreposta e coberta por camadas de papel filtro, ambos umedecidos em solução

desnaturante. Cobria-se o conjunto com uma pilha de 5 cm de papel toalha e uma placa de vidro era colocada por sobre todo o sistema para aumentar a superfície de contato e um peso sobre a placa, para aumentar o contato entre as camadas. A transferência do DNA para a membrana ocorria por um período entre 12-18 h (O'Reilly, 1992).

A membrana era então retirada, exposta à luz UV por 3 min para fixar as moléculas à mesma e então incubada à 80°C por 2 h em forno à vácuo, estando pronta para hibridização.

Para procedimento de hibridização, a membrana era umedecida em solução SSC 2X (Citrato de sódio 0,03 M; NaCl 0,3 M.) contendo SDS 0,1%. Em seguida era colocada em cilindro do forno Hybaid MKII contendo 7 ml de solução de hibridização (SSC 6X; Solução de Denhardt 5X; SDS 0,5%). Fazia-se então uma pré-hibridização à 68°C por 6 h sob agitação lenta. Antes da hibridização fervia-se a sonda e o DNA de esperma de salmão (100 µg/ml) por 5 min e incubava-se imediatamente em gelo. Substituíam-se então a solução do cilindro por mais 7 ml de solução de hibridização contendo a sonda e o DNA de esperma de salmão desnaturado, incubando-se à 68°C por 16 h, sob agitação. Removia-se a solução com a sonda e lavava-se a membrana por três vezes com SSC 2X, SDS 0,1% à 68°C por 30 min. Eram feitas lavagens subsequentes com SSC 1X, SDS 0,1% e SSC 0,5X, SDS 1%.

A membrana era envolvida em filme plástico, exposta à filme Kodak X-OMAT AR em cassete com intensificador e mantido à -80°C até a revelação.

15) Transfecção de células SF 9: Para infecção do vírus *v-rolA* em células SF 9 utilizou-se o processo de transfecção mediada por liposomos (cellfectina) de acordo com instruções do kit bac to bac (Life Technologies). Para confirmação da validade da metodologia foi feito controle com DNA viral de AcMNPV-L1.

Placas de Petri descartáveis de 60 mm eram semeadas, em meio TNMFH sem soro, com 8×10^5 células e incubadas à 27°C por 1 h para permitir a aderência das células. Eram adicionados 30 ml de reagente de cellfectina (GIBCO-BRL) a 1,5 ml de meio TNMFH sem soro em um tubo de poliestireno. Em outro tubo, eram misturados 1 µg de DNA viral em 1,5 ml de TNMFH sem soro. Misturava-se, então as soluções de cellfectina e de DNA, deixava-se descansar

por 5 min. Substituíam-se o meio das células pela mistura cellfectina/DNA e incubava-se de 4 à 5 horas à 27°C. Após este período, a mistura de transfecção era retirada, as células lavadas uma vez com meio TNMFH sem soro e em seguida, 4 ml de TNMFH completo eram colocados em cada placa. Incubava-se as placas à 27°C por 5 dias, com observação diária para visualização de células infectadas.

6) Seleção de vírus recombinantes: Após a transfecção era feita observação das células procurando-se vírus com o fenótipo ocluso negativo (sem poliedros). Por volta do 5º dia, coletava-se o sobrenadante, e ensaios de “plaque assay” eram feitos, com diversas diluições (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}), em duplicata para detecção de placas que não apresentassem poliedros (recombinantes).

Foram coletadas cinco placas com as características desejadas e, cada uma, era individualmente diluída em 1 ml de meio TNMFH e novamente submetida a ensaio de “plaque assay”, com cinco diluições (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}). Novas placas foram coletadas e repassadas por mais duas purificações por ensaios de “plaque-assay”, para obtenção de um isolado puro de vírus recombinante.

17) Microscopia eletrônica: Amostras de células de inseto sadias e infectadas com o vírus selvagem (AcMNPV-L1) e com o vírus recombinante (**v-rolA**) foram coletadas 48 horas após infecção, para observação em microscopia eletrônica. Utilizou-se a linhagem SF 9 para o experimento. O material foi preparado para visualização segundo protocolos modificados de Aldrich & Todd (1986).

As amostras (células) foram ressuspensas de frascos T-25, gentilmente centrifugadas (2.000 g/3 min), lavadas 2x com PBS 1x, ressuspensas em fixador (paraformaldeído/glutaraldeído) e incubadas por 1 h à temp. ambiente. O material foi coletado por centrifugação (2.000 g/2 min) e lavado em tampão cacodilato 0,1 M, 3 vezes por 10 min cada. Ressuspenderam-se as amostras em tampão de pós-fixação (tetróxido de ósmio 1%; Tampão cacodilato de sódio pH 7,2, 0,1 M.) por 30 min, seguida de uma lavagem com tampão cacodilato e uma lavagem com água. As amostras foram deixadas em solução de acetato de uranila 0,5% por 12 horas protegidas de luz. Seguiu-se desidratação em série com acetona 50% (duas vezes por 5 min), 70% (duas vezes por 10 min), 90% (uma vez por 20 min) e 100% (três vezes por 15 min). Após esta etapa, iniciou-se a infiltração em acetona/“spurr” (2:1) por 6 h; passando-se para

acetona: "spurr" (1:1) por 6 h; e "spurr" puro "overnight". Após uma última troca de "spurr" puro, fez-se incubação do material à 70°C por 72 horas para polimerização.

Os blocos foram cortados em micrótomo com navalha de diamante e as telinhas com espécime coradas com acetato de uranila 2%. A visualização foi feita em Microscópio JEOL - 100C.

18) Eletroforese de Proteínas (SDS-PAGE): As amostras de células saudáveis, infectadas com os vírus selvagem (AcMNPV-L1), e o vírus recombinante (**v-rolA**) foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS) para detecção de produto de expressão da sequência inserida no vírus.

Inicialmente as células eram ressuspensas do frasco T-25, sedimentadas (2.000 g/2 min). As células (precipitado) oriundas de cada frasco T-25 eram lavadas com PBS 1X e resuspensas em 0,2 ml de tampão de amostra 1X. Alíquotas de 3 ml de suspensão de células eram desnaturadas por aquecimento (100 °C, 3 min.) e aplicadas no gel após correção do tampão de amostra, bem como marcadores de peso molecular (Sigma).

O equipamento Mini-protean II, Electrophoresis Cell da Bio-Rad foi utilizado, permitindo que dois géis fossem corridos concomitantemente para análise do perfil de proteínas e "western-blotting".

O sistema de separação eletroforética era feito como descrito por Laemmli (1970), tendo sido o gel separador de 13%. Eram aplicados, no gel, 60 V durante a corrida no gel concentrador, aumentando-se para 120 V no gel separador. Para visualização dos perfis, o gel era imerso em solução de azul de Coomassie por 3 h, sob agitação, seguida por descoloração, por várias trocas de solução fixadora.

19) "Western blotting" e ensaio imunogênico: O gel a ser transferido era imerso por 15 min. em tampão de transferência (Trisma base 48 mM; glicina 39 mM; SDS 0,037%; metanol 20%). As proteínas eram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond C (Amersham), através do sistema de transferência semi-seca com eletrodos de grafite, de acordo com instruções do fabricante (Parmacia-LKB).

Um conjunto de papéis de filtro embebidos em tampão de transferência era colocado sobre o eletrodo inferior do aparelho. Sobre este último colocava-se a membrana de nitrocelulose (cortada nas mesmas dimensões do gel), e sobre ela o gel sobreposto de outro conjunto de papéis filtro úmidos. O sistema era então coberto com o eletrodo superior e uma corrente elétrica de 0,8 mA/cm² aplicada por 1h e 30 min. Para controle da transferência, a membrana de nitrocelulose era sempre corada com vermelho de Ponceau.

Para o ensaio de detecção, utilizou-se um anticorpo policlonal contra *RoIA*, produzido em camundongo. A membrana de nitrocelulose contendo as proteínas, era incubada por 12 h com solução bloqueadora (leite desnatado 5%, em PBS 1X.) à 4°C, sob agitação lenta, lavada em PBS 1x e a seguir, imersa em solução de PBS 1X contendo uma diluição de 1:1.000 do anticorpo anti-*RoIA*.

A incubação era feita à 4°C por 4 h, sob agitação. Após esta etapa, a membrana era lavada 3x em PBS 1x, por 15 min cada vez, e imersa em solução PBS 1X contendo uma diluição 1:8.000 de anti-imunoglobulina de camundongo ligada à peroxidase (kit ECL RPN2108 da Amersham), sendo mantida sob agitação à 4°C por 2 horas. Uma última lavagem da membrana era feita com PBS 1x para retirar anticorpos não ligados e a reação do complexo era detectada através de luminescência (com o kit ECL RPN2108), impresso em filme radiográfico com exposições de 5 min.

Resultados e Discussão

Inicialmente foi feita a digestão do plasmídeo pGras13 (contendo o fragmento da região codificadora do gene *rolA*) com as enzimas *Bam* HI e *Eco* RI. A banda com cerca de 300 pb foi eluída do gel de agarose de baixo ponto de fusão e submetido à extrações com fenol saturado com NaCl 1M, fenol:clorofórmio e fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. A quantificação do fragmento foi feita em gel de agarose 2%.

Em seguida foi feita a clivagem do plasmídeo Htb, com as enzimas *Bam* HI e *Eco* RI. Esse vetor foi selecionado do sistema de expressão Bac-to-Bac (Life Technologies), após avaliação da região aberta de leitura ("open reading frame"). Esse plasmídeo apresenta codificação para seis resíduos de histidina após o promotor e antes da seqüência codificadora da proteína a fim de facilitar sua purificação posterior por coluna de afinidade.

Após a ligação do inserto (*rolA*) e vetor (Htb) foi feita a transformação de células XL-1Blue e o isolamento dos plasmídeos por lise alcalina (mini-preps) para obtenção do clone. Este último foi então inserido, por eletroporação, em células DH10Bac (kit Bac-to-Bac) que contém, além do genoma bacteriano, o genoma viral. A recombinação do plasmídeo de transferência e o genoma viral se deu na região do gene *lacZ*. A seleção prévia dos recombinantes foi feita através da perda de coloração azulada em presença de X-Gal das células DH10Bac.

O DNA viral das potenciais colônias recombinantes foi extraído por ciclos de extração com fenol e clorofórmio. Em seguida foi feita a confirmação da presença do gene *rolA* utilizando-se a técnica de PCR com oligonucleotídeos específicos (*pic1* e *pic2*). Foi observado a presença de bandas de amplificação não específica nos experimentos controle de cada oligo isoladamente, no entanto com ambos os oligos apenas a banda de 300 pb, correspondente a *rolA*, foi amplificada. Os produtos amplificados por PCR foram então hibridizados contra sonda do gene *rolA* sintetizada com o kit Rediprime (Pharmacia) por "southern blot" (Fig. 1). Desta maneira dois clones foram selecionados e amplificados (*v-rolA1* e *v-rolA2*).

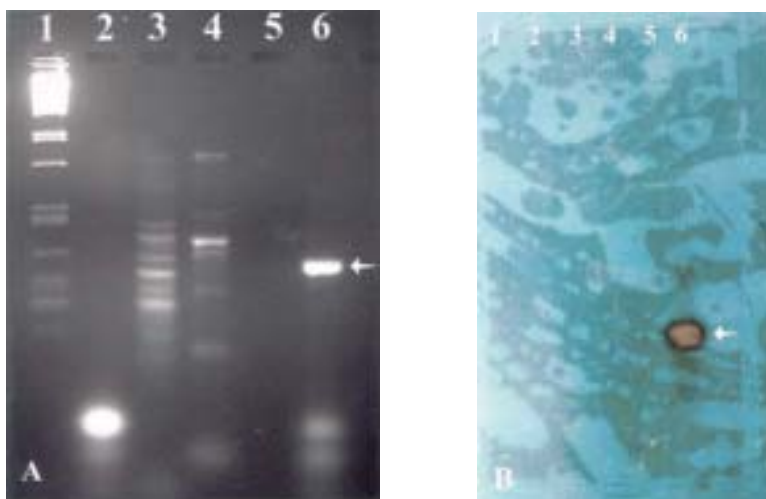


Fig. 1. Análise dos produtos de amplificação por PCR do DNA viral *v-rolA1* em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (A) e autoradiograma do "southern blot" (B): 1) marcador molecular 1/PstI; 2) oligos *pic1* e *pic2*, sem DNA molde; 3) somente oligo *pic1*; 4) somente oligo *pic2*; 5) DNA molde, sem oligos; 6) DNA molde e oligos *pic1* e *pic2*.

O DNA viral foi então transfectado em células de inseto SF 9 segundo as instruções do kit, utilizando o reagente cellfectina (GIBCO-BRL). Após incubação por 48 horas foram observados efeitos citopáticos de infecção nas células, sendo o sobrenadante coletado e estocado à 4°C. O mesmo experimento foi feito com o DNA viral de AcMNPV para controle.

Inicialmente células saudias e infectadas com o vírus recombinante (v-*rolA*) foram coletadas após 72 horas de infecção para análise por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS), para detecção de produto de expressão da seqüência inserida no vírus. A análise comparativa dos peptídeos de células infectadas com o vírus recombinante, em gel de poliacrilamida-SDS gradiente 10-18% corado com Coomassie Blue, é apresentada na Fig. 2. Inúmeras bandas são observadas no precipitado das células saudias e infectadas com v-*rolA*. Conforme esperado ocorre alteração do perfil protéico das amostras infectadas com vírus. Na amostra de células infectadas com v-*rolA* (Fig.2, poço 3) observou-se a presença de um peptídeo de cerca de 10 kDa, conforme esperado para *RoIA*. Além disso, não há produção de poliedrina uma vez que no vírus recombinante o locus do gene *polh* foi substituído pelo gene *rolA* levando à formação de vírus ocluso negativo.

Em seguida, para confirmação da síntese da proteína *RoIA* em sistema de baculovírus, foi feito o ensaio imunológico "western blot", utilizando-se um anticorpo policlonal contra a proteína de fusão GST-*RoIA* produzido em coelho. A detecção do peptídeo foi feita através de luminescência impressa em filme radiográfico com o kit ECL RPN2108 (Amersham). Um forte sinal de reconhecimento pode ser observado na amostra infectada com v-*rolA* (Fig. 3, poço 3), enquanto nenhum sinal foi observado na amostra de células SF 9 controle (Fig.3, poço 2).

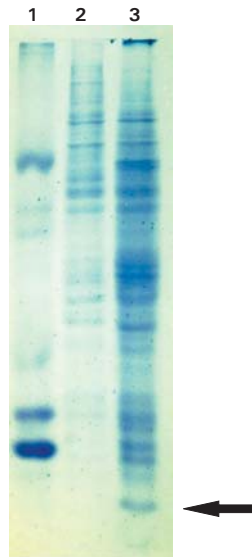


Fig. 2. Análise de produto de expressão em sistema baculovírus (RolA). Gel de poliacrilamida-SDS 13% corado com Coomassie blue, com amostras coletadas 48 horas após infecção: 1) peso molecular (Sigma); 2) células Sf9 controle; 3) células Sf9 infectadas com *v-rolA*.



Fig. 3. Análise do "Western Blot" de perfis: 1) marcador de baixo peso molecular (GIBCO/BRL); 2) células SF-9 controle; 3) células SF-9 infectadas com vírus recombinante *v-rolA*.

Finalmente, foi feita a análise ultraestrutural das células SF 9 controle e infectadas com os vírus AcMNPV-L1 e v-rolA por microscopia eletrônica de transmissão. Às 48 h.p.i. células infectadas já apresentavam hipertrofia do núcleo e dispersão da cromatina. Uma região de alta síntese de DNA e também de capsídeos no núcleo das células, denominada de estroma virogênico, pode ser observada tanto nas células infectadas com o vírus recombinante v-rolA (Fig. 4 A) quanto nas infectadas com o vírus AcMNPV-L1 (Fig. 4B). Entretanto a formação de corpos poliédricos, pela oclusão de vírions contendo de um a vários nucleocapsídeos, facilmente evidenciada após infecção com o vírus AcMNPV-L1 (Fig. 4B) não pode ser observada no vírus mutante por se tratar de um vírus ocluso negativo (Fig. 4A). Como esperado, nenhuma alteração morfológica foi visualizada nas células controle.

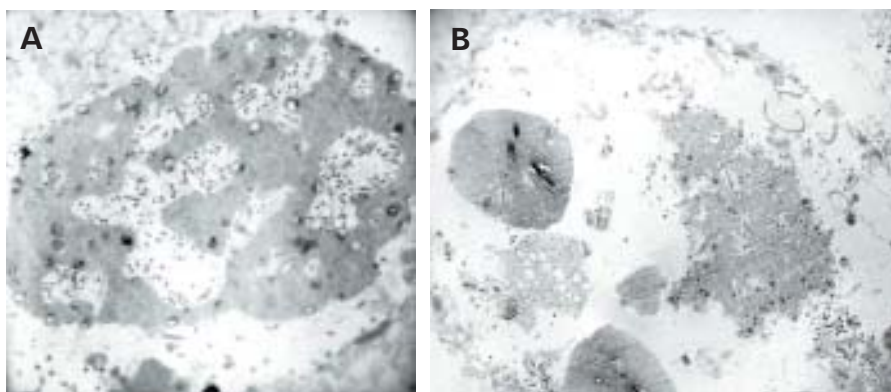


Fig. 4. Micrografias eletrônicas de células SF 9: (A) infectadas com vírus recombinante v-rolA (48 horas pós infecção); (B) infectadas com vírus AcMNPV-L1 (48 horas após a infecção).

O produto obtido da expressão do gene *rolA* no sistema baculovírus possui o tamanho esperado para a proteína RolA bem como reconhecimento pelo anticorpo anti-RolA produzido em coelho. Sugerindo fortemente que este peptídeo apresenta essas características da proteína originalmente expressa por *Agrobacterium rhizogenes*.

Numa próxima etapa quantidades maiores da proteína serão obtidas através de processos de infecção em cultura de células para sua purificação em coluna de afinidade por histidina (resina Ni-NTA) e posterior caracterização bioquímica. Anticorpos monoclonais também serão produzidos para estudos de localização

da proteína RolA em plantas infectadas com *Agrobacterium rhizogenes* e compreensão de seu modo de ação na arquitetura da planta.

Referências Bibliográficas

ALDRICH, H. C.; TODD, W. J. (Ed.). **Ultrastructural techniques for microorganisms**. Plenum, New York: Plenum, 1986.

AUSEBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. C. **Currents protocols in molecular biology**, New York: J. Wiley, 1994.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, H. H.; MILLER, L. K. Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*, Washington, DC, v. 27, p. 754-767, 1978.

MANDEL, M.; HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage infection. *Journal Molecular Biology*, Londo, v. 53, p. 159-162, 1970.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors** - a laboratory manual. New York: W. H. Freeman, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SLIGHTOM, J. L.; DURAND-TARDIS, M.; JOUANIN, L.; TETSER, D. Nucleotide sequence analysis of TL DNA of *Agrobacterium rhizogenes* *agropine* type plasmid: identification of open reading frames. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 261, p. 108-121, 1986.